



“Mohos zoospóricos” (Saprolegniales, Peronosporomycetes) causantes de oomicosis en huevos de anfibios: Estudio preliminar de los principales géneros involucrados

Steciow Mónica¹, Federico Oser² y Guillermo S. Natale²

¹ Instituto de Botánica Spegazzini (FCNyM, UNLP) – 53 # 477, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Investigaciones del Medioambiente CIM (CONICET-UNLP) Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - CONICET. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
Email: federicooser@gmail.com

RESUMEN

Los mohos acuáticos zoospóricos (Saprolegniales, Peronosporomycetes) son organismos saprótrofos ubicuos, parásitos de anfibios (huevos, juveniles, adultos) y de otros integrantes de la cadena trófica en ambientes acuáticos. Se analizaron y procesaron muestras de agua, materia orgánica y huevos de *Rhinella arenarum* mediante técnica de cebado, colectadas en un ecosistema acuático temporario del Pdo. La Plata (Bs. As., Argentina). Cinco géneros de organismos parásitos de huevos fueron registrados: *Achlya*, *Brevilegnia*, *Pythiopsis*, *Saprolegnia* y *Thraustotheca*, siendo *Pythiopsis* el género que más frecuentemente colonizó sustratos colocados en cajas de Petri analizadas. Se citan por primera vez en el país a los géneros *Brevilegnia*, *Pythiopsis* y *Thraustotheca* como parásitos de huevos de anfibios autóctonos. Las especies serán determinadas *a posteriori* por técnicas morfológicas y moleculares.

Palabras claves: ANFIBIOS – PERONOSPOROMYCETES – OOMICOSIS.

Introducción

Los mohos acuáticos zoospóricos incluyen formas saprótrofas y parásitas de algas, invertebrados, plantas, otros pseudohongos zoospóricos y vertebrados tales como peces, anfibios y mamíferos. Los organismos Peronosporomycota (Oomycota) integran los órdenes Leptomitales, Peronosporales, Pythiales, Saprolegniales, Rhipidiales y Sclerosporales (Johnson et al., 2002).

Una de las causas de la disminución de la diversidad de anfibios documentada a nivel global, es el aumento de su sensibilidad a enfermedades infecciosas entre las que se encuentran las oomicosis provocadas por algunas especies de Peronosporomycota. Los organismos causantes de oomicosis, de carácter cosmopolita, se dispersan mediante sus zoosporas y pueden parasitar a integrantes de distintos niveles de la cadena trófica (Johnson et al., 2002). Particularmente en anfibios autóctonos, se conoce por ejemplo que *Saprolegnia* spp. tiene impacto en las puestas produciendo variación en sus tiempos de eclosión e incluso en ocasiones genera mortalidad significativa en virtud del

quimiotaxismo que poseen las zoosporas asexuales (Perotti et al., 2013).

Esta contribución es iniciada en Octubre del año 2018 tras observar, en un ambiente acuático temporario presente en la Pcia. de Buenos Aires, ovas de *Rhinella arenarum* sobre las cuales se desarrollaban micelios no identificados. Se propuso como objetivo entonces identificar la micobiota que habita este ambiente donde la especie *R. arenarum* se reproduce.

R. arenarum es una especie de anfibio autóctono que se reproduce a principios de la primavera, colocando sus puestas en cordones gelatinosos que quedan adosados a la vegetación en la interfase aire-agua.

La taxonomía de mohos acuáticos se basa en características de las estructuras reproductivas asexuales (zoosporangios) y sexuales (oogonios, ramas anteridiales y oosporas).

En cuanto a las estructuras asexuales se consideran la forma, tamaño, disposición y ramificación del zoosporangio (proliferación interna, renovación cimosa, basípeta o simpodial) y el tipo de descarga de las zoosporas la cual puede ser saprolegnoide, aclioide, o brevilegnoide, entre las más frecuentes. En el tipo saprolegnoide, las

zoosporas primarias piriformes emergen rápidamente a través de un poro de salida del zoosporangio, y luego de un periodo de movilidad, se enquistan generando una zoospora secundaria reniforme (característico de *Saprolegnia* spp.). En el caso aclioide, las zoosporas primarias se enquistan al emerger del zoosporangio formando una acumulación de quistes en su extremo, los cuales germinan dando lugar a las zoosporas secundarias (característico de *Achlya* y *Protoachlya* Coker). En el tipo brevilegnoide o thraustothecoide, las zoosporas primarias se enquistan dentro del zoosporangio, son liberadas por delicuescencia de la pared, variando las morfologías de los zoosporangios y a veces acompañados por la descarga aclioide (característico de *Brevilegnia* y *Thraustotheca*). En *Pythiopsis*, la liberación de las zoosporas es monomórfica, y solo se liberan zoosporas primarias.

Materiales y Métodos

El sitio de hallazgo es un cuerpo de agua temporario, ubicado en el Pdo. de La Plata (34°59'05.3"S 57°51'22.7"O). Muestras de agua, vegetación asociada y huevos con aparente infección (Fig. 1.), fueron trasladadas al laboratorio. Los huevos fueron observados bajo lupa binocular y microscopio constatándose en ellos la presencia de organismos Peronosporomycetes infecciosos (Fig. 2.).



Fig. 1. Porción de puesta con micelios de los géneros encontrados.



Fig. 2. Detalle micelios con zoosporangios sobre de ovas de *R. arenarum*

Con el fin de aislar e identificar la micobiota presente en todas las muestras colectadas, se colocaron fracciones en cajas de Petri con agua

estéril a la que se le añadieron semillas de sésamo esterilizadas como sustrato de crecimiento. A partir de las semillas colonizadas se realizaron aislamientos unifúngicos en medios agarizados (YPG, YPSs, entre otros) con solución antibiótica a partir de hifas de micelio o zoosporas, de acuerdo a metodología estandarizada. Se obtuvieron cultivos unifúngicos libres de contaminación bacteriana. La identificación taxonómica a nivel genérico de los organismos aislados se realizó mediante el reconocimiento de sus estructuras reproductivas sexuales y asexuales, utilizando microscopio (Olympus BX 40) según los trabajos de Fuller & Jaworski (1987) y Johnson y colaboradores (2002). Muchos de estos mohos parásitos no logran desarrollar estructuras asexuales, por lo que en estos casos se recurrirá a estudios moleculares para su reconocimiento por códigos de barras genéticos.

Asimismo, se calculó la Frecuencia de colonización porcentual para cada género (FC%): (número de cápsulas colonizadas/ número de cápsulas analizadas) X 100, habiéndose analizado en total 55 cajas de Petri.

Resultados

En principio, en las muestras de huevos analizados, se encuentran involucrados 5 géneros en la masa miceliar mucilaginoso que invade a gran parte de las puestas (Tabla 1). Entre los géneros que poseen micelio robusto figuran *Achlya* C.G Nees y *Thraustotheca* Humphrey (descarga aclioide) con el desarrollo de oosporas excéntricas. Entre los géneros con desarrollo intermedio se hallaron los micelios de especies de *Brevilegnia* Coker & Couch (descarga brevilegnoide), con esporangios característicos. Los micelios más vigoroso y con numerosas yemas, pertenecieron a los géneros *Pythiopsis* de Bary y *Saprolegnia* C.G. Nees (descarga saprolegnoide), desarrollando en algunos casos oosporas subcéntricas-céntricas. En el área bajo estudio el género *Pythiopsis* aparece con mayor frecuencia, seguido por los géneros *Achlya* y *Saprolegnia*, y en menor proporción por *Brevilegnia* y *Thraustotheca*.

Tabla 1. Frecuencia de colonización porcentual de los distintos géneros

| Género | FC% |
|---------------|-----|
| Achlya | 24 |
| Brevilegnia | 6 |
| Pythiopsis | 36 |
| Saprolegnia | 21 |
| Thraustotheca | 5 |

Discusión

Los organismos Peronosporomycota representan un grupo de organismos que coexisten e infectan huevos de anfibios, por lo que esta relación ecológica podría llegar a representar un alto riesgo para las poblaciones de anfibios dadas nuevas condiciones ambientales debido al cambio climático global (Kiesecker et al., 2001). Estos organismos “mohos acuáticos” son un factor de mortalidad significativa de anfibios, y su potencial patogenicidad varía de acuerdo a las condiciones ambientales locales. Estas variaciones pueden estar dadas como un efecto provocado por la presencia de estresores ambientales producto de la actividad antrópica (Ruthig, 2009); por variaciones de factores ambientales tales como temperatura, pH, radiación ultravioleta (RUV); o por la calidad del agua de los sitios reproductivos por anfibios (Kiesecker et al., 2004; Ruthig, 2009). Algunos autores afirman que algunos Peronosporomycetes son invasores de ovas, estableciéndose normalmente en ovas muertas desde donde se extienden hacia los huevos sanos más próximos, causando pérdidas en los primeros estadios del desarrollo (Robinson et al., 2003). Dado que los Oomycetes a menudo actúan como saprófitos, es importante poner a prueba sus efectos sobre los anfibios para determinar si también pueden actuar como patógenos (Ruthig, 2009). En nuestro país, son escasos los trabajos en relación con la infección de anfibios anuros autóctonos con organismos Peronosporomycetes. Poco se ha estudiado acerca de la relación de estas interacciones ecológicas con las condiciones locales donde los anfibios habitan. Perotti y colaboradores (2013) hallaron, por ejemplo, que las especies *Saprolegnia diclina*, *S. ferax* y *S. parasitica* (clase Oomycota) infectan oviposaduras de *Pleurodema thaul* en humedales de bosques patagónicos, y en relación a las características fisicoquímicas de estos ambientes encontraron que un aumento de la temperatura se relaciona con un mayor número de ovas infectadas. Este estudio preliminar, iniciado en octubre del año 2018, representa un avance en nuestro país considerando el hallazgo de los géneros *Brevilegnia*, *Pythiopsis* y *Thraustotheca* como causantes de las oomicosis en ovas de anfibios autóctonos. Por lo tanto, se propone continuar esta línea de investigación considerando que pueden existir otros géneros involucrados. La propuesta es la realización de estudios de manera estacional y periódica, considerando distintas especies de anfibios, durante todas las

etapas de su desarrollo, y considerar además diversas condiciones ambientales.

Referencias

- Fuller M.S. y Jaworski A. 1987. *Zoosporic fungi in teaching and research* (No. 3). Athens, Georgia: South. Publis.Corp.
- Kiesecker J.M., Blaustein A.R. y Belden L.K. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681–684.
- Kiesecker J.M., Belden L.K., Shea K. y Rubbo M.J. 2004. Amphibian Decline and Emerging Disease: What can sick frogs teach us about new and resurgent diseases in human populations and other species of wildlife?. *American Scientist*, 92(2), 138-147.
- Johnson T.W., Seymour R.L. y Padgett D.E. 2002. *Biology and Systematics of the saprolegniaceae*. Online publication: <http://www.ilumina-dlib.org>, 1028.
- Perotti M.G., Basanta M.D., Steciow M.M., Sandoval-Sierra J.V. y Diéguez-Urbeondo, J. 2013. Early breeding protects anuran eggs from *Saprolegnia* infection. *Austral Ecology*, 38(6): 672-679.
- Robinson J., Griffiths R.A. y Jeffries P. 2003. Susceptibility of frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*) eggs to invasion by *Saprolegnia*. *Amphibia-Reptilia* 24(3):261- 268.
- Ruthig G.R. 2009. Water molds of the genera *Saprolegnia* and *Leptolegnia* are pathogenic to the North American frogs *Rana catesbeiana* and *Pseudacris crucifer*, respectively. *Diseases of Aquatic Organisms* 84(3):173-178.